

9月11日

特別企画：ロタウイルスワクチン導入とその影響

我が国におけるロタウイルス流行の現状と今後

堤 裕幸

札幌医科大学医学部・小児科

本邦においてもロタウイルス胃腸炎は小児において頻度・重症度から最も重要な消化管感染症である。3歳以下の乳幼児に多く、重症な下痢により脱水を呈することがあり、消化管外の合併症もみられる。ロタウイルスは様々な遺伝子型を有する。当教室において1987～2009年に保存された札幌市の便検体の解析では、2000年まではG1P[8]がほとんどであったが、2001年以降はG3P[8]が主流となっている。新しいロタウイルスワクチンの導入が臨床疫学、分子疫学にどのような変化をもたらすかが注目される。

9月11日

特別企画：ロタウイルスワクチン導入とその影響

ヒトロタウイルスの分子疫学：最近の動向について —G・P型分布の世界的状況、全ゲノム配列に基づく遺伝子型別、 ロタウイルス株の新たな命名法—

小林宣道

札幌医科大学医学部衛生学

ロタウイルス（A群ロタウイルス）は、乳幼児の急性重症胃腸炎の主な原因ウイルスであり、開発途上国、先進国を問わず普遍的に分布する。ロタウイルスはレオウイルス科（family *Reoviridae*）の一員であるロタウイルス属（genus *Rotavirus*）に分類され、11本の分節化した二本鎖RNAをゲノムとして有する。ロタウイルス粒子の最外層を構成するVP7、VP4には中和抗原が存在し、これらの蛋白の遺伝子配列に基づきそれぞれG遺伝子型（G型、G-type）、P遺伝子型（P型、P-type）が規定される。動物のロタウイルスも含めると、現在までに27のG型、35のP型が報告されており、それらの組み合わせによる多数の遺伝子型が存在する。ヒトロタウイルスでは少なくとも11のG型、13のP型が検出されているが、世界中で検出されるロタウイルス野外株の大部分は主要な5種類の遺伝子型（G1P[8]、G2P[4]、G3P[8]、G4P[8]、G9P[8]）で占められる。

ヒトロタウイルス主流株のG型、P型は国・地域により異なり、また年により変化することが知られる。ロタウイルスワクチンが多くの子で導入されつつある中、ロタウイルスの遺伝子型を全世界レベルで把握することは益々重要となっている。ロタウイルスワクチンの普及と相まって、ロタウイルスの遺伝子型に関しては世界各国・地域でサーベイランスが行なわれ、情報が蓄積されつつある。こうしたサーベイランスは各国の保健担当部局や研究機関のほか、アジア、アフリカ、東地中海地域、ラテンアメリカ・カリブ海地域においてはWHO地域事務所および米国CDCが支援するサーベイランスネットワークを通じて行なわれている。欧州では独自のネットワーク（EuroRotaNet）により実施されている。この演題では世界の主要な地域におけるロタウイルスG型、P型の最近の動向（2000年以降）について概説する。最近の傾向をごく簡単に述べると、世界的にはG1株優位の地域が多いが、東アジア・東南アジアではG3、南アジアではG2の割合が高く、アフリカでは多様な遺伝子型が混在するのが特徴である。

ロタウイルスの疫学調査には従来専らG型、P型が用いられてきたが、2008年にロタウイルス分類ワーキンググループ（RCWG）により11本の全RNA分節の配列に基づく遺伝子型別法が提唱された。この型別法ではVP7-VP4-VP6-VP1-VP2-VP3-NSP1-NSP2-NSP3-NSP4-NSP5の各ウイルス蛋

白遺伝子に対し、G-P-I-R-C-M-A-N-T-E-H の各遺伝子型を割り当てるものであり、Gx-P[x]-Ix-Rx-Cx-Mx-Ax-Nx-Tx-Ex-Hx (x は型別番号) のように表記される。現在までに 27(G)、35(P)、16(I)、9(R)、9(C)、8(M)、16(A)、9(N)、12(T)、14(E)、11(H)種類の遺伝子型が同定されている。この遺伝子型別に各遺伝子分節の系統解析を加えた全ゲノム配列の解析が、ロタウイルスの分子疫学的研究において最近盛んに行なわれるようになってきた。全ゲノム配列に基づく遺伝子型別・分子疫学的解析は、ロタウイルスの地域間伝播、ヒト・動物間の種間伝播、遺伝子再集合体の形成等を解明し、本ウイルスの生態を理解する上で不可欠であり、またロタウイルスワクチン導入前後のサーベイランスにおいても重要な意義を持つと考えられる。我々の最近の研究成果の中から、アジア、アフリカのヒトロタウイルス株について全ゲノム配列解析により得られた興味深い知見を報告する。

近年全遺伝子配列が決定されるロタウイルス株が増加する中、ロタウイルス株の名称の付与には標準化された方法がない状況に鑑み、RCWG では 2011 年 5 月、ロタウイルス株の統一化された命名法を提案した。その命名法では、各ロタウイルス株について次のような形式で株に関連する情報を記載する形となっている。

RV group / species of origin-tissue culture or wild type / country of identification / common name / year of identification / G- and P-type

例えば、A 群 ヒトロタウイルス Wa 株は、RVA/Human-tc/USA/Wa/1974/G1P1A[8]のように記載される。この命名法については若干改善の余地もあると思われるが、今後論文や各種報告においてロタウイルス株を記載する場合、RCWG 提案の本命名法を用いることになると考えられる。

参考文献

<ロタウイルス遺伝子型の世界的な動向>

- 1) Vaccine, 27: Suppl 5, 2009
- 2) J Infect Dis, 200: Suppl 1, 2009
- 3) J Infect Dis, 202: Suppl 1, 2010
- 4) Pediatr Infect Dis J, 30: Suppl, 2011

<全ゲノム配列に基づく分子疫学>

- 1) J Virol, 82:3204-3219, 2008
- 2) Arch Virol, 153:1621-1629, 2008
- 3) Future Microbiol, vol.6 (Sep.), 2011 (in press)

<新たな命名法>

- 1) Arch Virol, 156:1397-1413

9月11日
トピックス

第52回日本臨床ウイルス学会報告

三好龍也
堺市衛生研究所

平成23年6月11日、12日の2日間の日程で、第52回日本臨床ウイルス学会が三重県津市で開催されました。下痢症ウイルス関連では、シンポジウムが1つ、一般演題では、ロタウイルス関連が6題、Cardiovirus関連が1題ありました。

シンポジウム

「腸管感染ウイルス～疫学から多彩な臨床像まで～」

- ・愛知県の感染症発生動向調査において検出される腸管感染ウイルス
山下 照夫 (愛知県衛生研究所)
- ・アジア地域におけるエンテロウイルス71感染症の流行
清水 博之 (国立感染症研究所)
- ・重症ロタウイルス感染症の病態
河島 尚志 (東京医科大学)
- ・ロタウイルス感染症の基礎と臨床
谷口 孝喜 (藤田保健衛生大学)

一般演題

- ・京都府南丹地区におけるロタウイルス胃腸炎入院に起因する疾病負担とその評価
伊藤陽里 (公立南丹病院)
- ・Genetic characterization of group A rotavirus circulating among children with acute gastroenteritis in Japan in 2009-2010
Thongprachum Aksara (東京大学)
- ・札幌市におけるヒトロタウイルス G2P[4]株 VP7 遺伝子の解析
辰巳正純 (札幌医科大学)
- ・ロタウイルス抗原血症の病態解明：マトリックスメタロプロテアーゼの関与
河村吉紀 (藤田保健衛生大学)
- ・岡山県における G2 型 A 群ロタウイルスの流行状況について
葛谷光隆 (岡山県環境保健センター)
- ・栃木県那須地方におけるロタウイルス流行株のウイルス学的特性に関する検討
市川万邦 (国際医療福祉大学)
- ・感染性胃腸炎 2 症例から分離された Saffold Cardiovirus
内野清子 (堺市衛生研究所)

シンポジウムでは、山下照夫先生(愛知県衛生研究所)からは、愛知県における腸管感染ウイルスの検出状況について発表があり、ノロウイルス、ロタウイルスなど様々な下痢症ウイルスが関係し、年や季節単位で異なった消長が認められるという報告でした。河島尚志先生(東京医科大学)からは、ロタウイルス感染症において脳炎、脳症などの重症例について解析・検討された。

嘔吐・下痢がけいれんに先行し coma になる重積群、下痢を伴う良性けいれんの群発群について、

IL-6 などのサイトカインの上昇の関連などについて発表された。谷口孝喜先生(藤田保健衛生大学)からは、RotaTeq、Rotarix のワクチン効果について発表されました。

一般演題では、伊藤陽里先生(公立南丹病院)からはロタウイルス胃腸炎入院による疾病負担費について評価し、ロタウイルスワクチン導入に評価と予防戦略の課題が発表された。ワクチン導入後ロタウイルスの流行が変化することが危惧されていることから、辰巳正純先生(札幌医科大学)からは、札幌市で検出されたロタウイルス G2P[4]株の遺伝子解析結果と遺伝子の変遷を把握する重要性が発表された。また、葛谷光隆先生(岡山県環境保健センター)からは、岡山県における G2 型ロタウイルスの解析結果およびその必要性が報告された。内野清子先生(堺市衛生研究所)からは、Saffold Cardiovirus が分離された胃腸炎 2 症例の発表がありました。

9月11日
トピックス

国際学会：日米医学ウイルス、免疫部会 (Palo Alto, CA, U.S.A)
Joint meeting of the US Japan Immunology Board and
Viral Diseases Panel (June 20~22, 2011)

中込 治
長崎大学医学部・衛生学

第45回日米医学ウイルス性疾患専門部会は、6月20日~22日の3日間にわたり米国カリフォルニア州パロアルトにあるスタンフォード大学で同大学のHarry Greenberg教授とMark Davis教授をlocal hostとして開催された。今回会期が3日間に及んだのは、ウイルス部会と免疫部会との完全な合同会議の形態で行われたためである。また、演者は事実上部会員(プラス1名前後)に限定された。通常のウイルス性胃腸炎のセッションはなかったが、スタンフォード大学Harry Greenbergと長崎大学の中込治が座長を務めたセッションでは、米国側1題(Harry Greenberg)、日本側3題(長崎大Osamu Nakagomi、大分大学Kamruddin Ahmed、感染研Hans Grantsmann)の合計4題の発表があった。内容的にはロタウイルスに関する演題が3題(日本2、米国1)、ノロウイルスに関する演題は日本から1題であった。以下に要約を示す。

米国側の発表:

Rotavirus Host Range Restriction, The Innate and Acquired Immune Response- A Menage a Trois
Harry Greenberg, Stanford University

- In interferon receptor and Stat1 deficient mice, some strains of RV replicate more efficiently and extend their cell tropisms to epithelia beyond the gut such as the biliary tree.
- The ability of rotaviruses to inhibit an interferon mediated antiviral response is species and tissue specific and is regulated by strain related sequences of the NSP1 gene.
- NSP1 and VP4 play important roles in regulating replication potential in vivo in the gut and biliary tract epithelium.
- Both RIG I and MDA 5 play critical and redundant roles in detecting rotavirus replication in fibroblasts.
- PKR also seems to be required for the expression of interferon following rotavirus infection.
- Plasmacytoid dendritic cells are also involved in modulating the host response to RV infection in vivo by secreting type I interferon that augments B cell activation and the timely induction of a local IgA response following infection.

日本側の発表:

Possible occurrence of genotype shift to G2P[4] after the introduction of the monovalent G1P[8] human rotavirus vaccine.

Osamu Nakagomi, Nagasaki University

- We postulated a hypothesis that the vaccination with the monovalent G1P[8] vaccine created conditions in which G2P[4] rotavirus strains acquired selective advantage over P[8] strains.
- We conducted a case-control study to show that the monovalent G1P[8] vaccine was up to 85% effective against G2P[4] rotavirus.
- Re-emergence and sharp increase of G2P[4] strains in various geographic locations were accompanied by the D96N substitution in the VP7 protein.
- The lineage shift over time in the G2 VP7 gene appears to suggest the presence of natural selection process (due to the immunity formed in the population).

Antigenemia does not represent viremia during rotavirus diarrhea

Kamruddin Ahmed, Oita University

- The study was done to explore whether viremia is present in children with rotavirus diarrhea.
- A total of 250 serum samples were collected from children under 5 years of age with rotavirus diarrhea in Dhaka, Bangladesh and in Ankara, Turkey.
- Four serum samples from patients with high antigenemia level were concentrated by ultracentrifugation and examined under the electron microscope. However, no rotavirus particle was observed.
- Interleukin (IL)-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, tumor necrosis factor alpha, granulocyte macrophage-colony stimulating factor and interferon gamma were measured; their levels were not significantly different between patients with and without antigenemia.
- No correlation was present between the rotavirus copy numbers in serum samples and antigenemia levels.
- Viral genome within the virion is not digested by treatment with endonuclease, whereas rotavirus genomic RNA from serum samples with antigenemia was digested upon treatment with benzonase endonuclease.
- These results provided evidence that viremia was absent in children with rotavirus diarrhea.

Rare noroviruses binding to human histo-blood group antigens

Grant Hansman, National Institute of Infectious Diseases

- To understand how norovirus recognize HBGAs, crystal structures were determined of norovirus protruding domains from two rarely detected GII genotypes, GII.10 and GII.12, alone and in complex with a panel of HBGAs.
- The GII.10- and GII.12-apo structures as well as the previously solved

- GII.4-apo structure resembled each other, and all three GII structures showed similar modes of HBGA recognition.
- The primary GII norovirus-HBGA interaction involved six hydrogen bonds between a terminal áfucose1-2 of the HBGAs and a dimeric capsid interface, which was composed of elements from two protruding subdomains.
 - A site of GII norovirus-sequence was identified that resides under the critical áfucose1-2 and that was one of the few patches of conserved residues on the outer virion-capsid surface.
 - The site was smaller than involved in full HBGA recognition, a consequence of variable recognition of peripheral saccharides. Despite this evasion tactic, the HBGA site of viral vulnerability may provide a viable target for small molecule- and antibody-mediated neutralization of GII norovirus.

9月11日
トピックス

ロタウイルスの新知見

藤井 克樹

国立感染症研究所 ウイルス第二部 第一室

ロタウイルス研究の現状について、昨年のウイルス性下痢症研究会以降に公表された論文の中から代表的なものを抜粋して以下に記載した。その中から主な論文を取り上げて要点を解説する。

1. ワクチン・疫学

Cost-effectiveness analysis of a universal rotavirus immunization program in Japan. Sato T et al. *Jpn J Infect Dis.* 2011, 64(4):277-83

ロタウイルスワクチンを日本に導入した場合の費用対効果に関する研究。社会的な観点からロタウイルスワクチンが費用対効果に優れていることが示された。

Projecting the effectiveness of RotaTeq® against rotavirus-related hospitalizations and deaths in six Asian countries. El Khoury A et al. *Hum Vaccin.* 2011, 7(5):506-10

アジア地域（中国、香港、インド、韓国、台湾、タイ）における5価ロタウイルスワクチンであるロタテックの予防効果に関する疫学調査。いずれの調査においても、ワクチン接種によりロタウイルス感染に起因する入院数や死亡数が大幅に減少している。

Human rotavirus vaccine is highly efficacious when coadministered with routine expanded program of immunization vaccines including oral poliovirus vaccine in Latin America. Tregnaghi MW et al. *Pediatr Infect Dis J.* 2011, 30(6):e103-8.

ロタリックスと弱毒生ポリオワクチンを同時接種しても有効性や副反応の発生率に変化はない。

Protective effect of natural rotavirus infection in an Indian birth cohort. Gladstone BP et al. *N Engl J Med.* 2011, 365(4):337-46.

インドにおけるロタウイルス自然感染による防御効果に関する出生コホート研究。早期感染や頻回再感染が発生する地域では十分な防御効果が得られない可能性がある。

Monitoring of group C rotavirus in children with acute gastroenteritis in Brazil: An emergent epidemiological issue after rotavirus vaccine? Luchs A et al. *J Med Virol.* 2011, 83(9):1631-6

ブラジルにおける C 群ロタウイルス感染症例数に関する報告。ワクチン導入後に C 群ロタウイルス感染症例数が上昇する可能性を指摘。

上昇はない。(ブラジル)

2. ウイルス遺伝子と機能

Roles of VP4 and NSP1 in determining the distinctive replication capacities of simian rotavirus RRV and bovine rotavirus UK in the mouse biliary tract. Feng N et al. *J Virol.* 2011, 85(6):2686-94

サルロタウイルス (RRV) とウシロタウイルス (UK) のリアソータントについて、マウス胆管細胞での複製効率を調べた結果、RRV の VP4 と UK の NSP1 が細胞内侵入とウイルス複製において優勢に働くと考えられた。

The Rhesus Rotavirus Gene Encoding VP4 Is a Major Determinant in the Pathogenesis of Biliary Atresia in Newborn Mice. Wang W et al. *J Virol.* 2011, 85(17):9069-77

サルロタウイルス RRV をマウスに接種した時に引き起こされる胆道閉鎖症の発症因子は VP4 が担っている。

Rhesus rotavirus entry into a polarized epithelium is endocytosis dependent and involves sequential VP4 conformational changes. Wolf M, Vo PT, Greenberg HB. *J Virol.* 2011, 85(6):2492-503

サルロタウイルス RRV はエンドサイトーシスにより上皮細胞へ侵入する。その際 VP4 の構造変化を伴う。

Modification of the trypsin cleavage site of rotavirus VP4 to a furin-sensitive form does not enhance replication efficiency. Komoto S et al. *J Gen Virol.* 2011, (in printing)

VP4 の trypsin 切断部位を、内因性プロテアーゼである furin の切断モチーフに変えてもウイルスの複製効率は上がらない。

Reconciliation of rotavirus temperature-sensitive mutant collections and assignment of reassortment groups D, J, and K to genome segments. Criglar J et al. *J Virol.* 2011, 85(10):5048-60

アメリカ NIH で分離されたサルロタウイルス株の温度感受性ミュータントをリアソートメントグループごとに分類し、VP7 の T280I 変異、NSP1 の L140V 変異、NSP5 の A182G 変異がそれぞれ温度感受性に関わっていることが示された。

Dual selection mechanisms drive efficient single-gene reverse genetics for rotavirus. Trask SD et al. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010, 107(43):18652-7

NSP2 における温度感受性変異と RNAi を組み合わせた二重選択による単一遺伝子リバースジェネティクス法を開発し、リコンビナントウイルスの効率的な回収を可能にした。

Rotavirus VP2 core shell regions critical for viral polymerase activation.

McDonald SM, Patton JT. *J Virol.* 2011, 85(7):3095-105

三重層ウイルス粒子の最も内側を構成するコアタンパク質 VP2 は RNA ポリメラーゼ VP1 の活性化に重要な役割を果たす。

Residues of the rotavirus RNA-dependent RNA polymerase template entry tunnel that mediate RNA recognition and genome replication. Ogden KM et al. *J Virol.* 2011, 85(5):1958-69

ロタウイルスの RNA 依存性 RNA ポリメラーゼの dsRNA 認識部位におけるアミノ酸変異がゲノム RNA の複製効率に影響する。

Active participation of cellular chaperone Hsp90 in regulating the function of rotavirus nonstructural protein 3 (NSP3). Dutta D et al. *J Biol Chem.* 2011, 286(22):20065-77

細胞内のシャペロン分子 HSP90 がロタウイルス NSP3 の機能調節に重要な役割を果たしている。

Short hairpin RNA-mediated silencing of bovine rotavirus NSP4 gene prevents diarrhoea in suckling mice. Chen F et al. *J Gen Virol.* 2011, 92:945-51

NSP4 に対する Short hairpin RNA がマウスに対する重症下痢症の発症を防ぐ。

Atomic model of an infectious rotavirus particle. Settembre EC et al. *EMBO J.* 2011, 30(2):408-16

低温電子顕微鏡を用いたロタウイルス粒子の構造解析。VP4 の切断前および後 (VP5、VP8) の分子構造および他のウイルス構造タンパク質とのインタラクションについて解析。

3. ウイルスに対する生体反応・免疫応答

Rotavirus replication requires a functional proteasome for effective assembly of viroplasm. Contin R et al. *J Virol.* 2011, 85(6):2781-92

プロテアソームの機能を阻害すると viroplasm の形成に支障を来すため、ロタウイルスの複製が阻害される。 *Bor tezomib. MG132.*

Diversity of interferon antagonist activities mediated by NSP1 proteins of different rotavirus strains. Arnold MM, Patton JT. *J Virol.* 2011, 85(5):1970-9

ヒトロタウイルスの NSP1 は、IRF5 と IRF7 の発現を低下させることにより IFN-beta のシグナルを抑制している。他の動物由来ロタウイルスの NSP-1 は IRF3 の発現も低下させる。

RIG-I/MDA5/MAVS are required to signal a protective IFN response in rotavirus-infected intestinal epithelium. Broquet AH et al. *J Immunol.* 2011, 186(3):1618-26

ロタウイルス感染腸管上皮細胞からの IFN-beta 産生には、RIG-I/MDA5 - MAVS シグナルが必要である。

Immunogenicity of a scalable inactivated rotavirus vaccine in mice. Zhang Bet al. Hum Vaccin. 2011, 7(2):74-80

マウスを用いた不活化ロタワクチンの効果を検討。不活化ワクチン接種により中和抗体および T 細胞応答が誘導される。

Immune mediators of rotavirus antigenemia clearance in mice. Marcelin G et al. J Virol. 2011, 85(15):7937-41

SCID マウスを用いた抗体およびリンパ球移入実験。ロタウイルス抗原排除にはリンパ球が必要であるが、T 細胞、B 細胞の両方が必須というわけではない。抗体は一時的に抗原血症を低下させるが、完全には排除できない。

9月11日
トピックス

ノロウイルスの新知見 村上 耕介

国立感染症研究所 ウイルス第二部 第一室

ヒトに感染するノロウイルスは、培養細胞で効率的に増殖させられないため、ウイルスの感染、侵入メカニズムに多くの謎が残されている。一方で、マウスやウシなどの動物由来のノロウイルスの一部は、培養細胞での増殖が可能であることから、これらのウイルスを用いた感染、侵入メカニズムの解析が行われており、マウスノロウイルスに続いて、ウシノロウイルスについてもその知見が得られつつある。

近年、ノロウイルス粒子の構造の解明が精力的に進められており、ウイルスタンパク質の X 線結晶構造解析により、粒子の立体構造が明らかにされつつある。さらにはノロウイルスとの結合が議論されている組織血液型抗原との相互関係についても、構造生物学の視点からの解析が進行中である。また、ウイルス学とは異なる視点からの解析法として、イオン移動度質量分析法を用いたカプシドタンパク質構築の解明が報告されている。

ノロウイルスの疫学研究は依然として重要な位置を占めており、毎年多くの論文が発表されている。近年のウイルス濃縮、検出技術の向上により、従来の糞便からの解析に加えて、環境水、土壌、食品中のノロウイルスを高感度に検出することが可能となった。これらの知見がさらに蓄積されることで、環境中においてノロウイルスがどのように循環しているのか、その経路が解明されることが期待される。

ノロウイルスは食中毒の主要原因でもあるが、食品中のウイルスを効率的に不活化する技術の開発が行われている。前述のマウスノロウイルスが不活化技術の開発に多く用いられており、電子線、オゾン、加圧処理により不活化されることが報告されている。(ちなみに PubMed で "Murine Norovirus" で検索すると、2011年8月11日現在、2011年発表の論文が42件表示され、その1/3がウイルス不活化に関する論文)

本演題では、2011年に報告された論文から、以上の内容に沿った数点をピックアップし、その概要を紹介する。